

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren: Prof. Dr. med. H. G. Lasch, Prof. Dr. med. H. J. Dengler

Untersuchungen zur Charakterisierung eines neuen abnormen Hämoglobins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Hanns-Ulrich Wagner
aus Gießen

Gießen 1970

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren: Prof. Dr. med. H. G. Lasch, Prof. Dr. med. H. J. Dengler

Untersuchungen zur Charakterisierung eines neuen abnormen Hämoglobins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Hanns-Ulrich Wagner
aus Gießen

Gießen 1970



Dekan:	Prof. Dr. E. Habermann
Referent:	Priv. Doz. Dr. W. Wörner
Korreferent:	Prof. Dr. L. Rôka

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

1.0 Einführung

1.1 Historischer Überblick

1.2 Struktur und Vorkommen der normalen Hämoglobine

1.3 Die anomalen Hämoglobine

1.4 Vorkommen der Hämoglobinanomalien

2.0 Problemstellung

3.0 Kasuistik

4.0 Material und Methoden

4.1 Blutentnahme und Aufbewahrung

4.2 Herstellung der Hämoglobinlösung

4.3 Stärkeblockelektrophorese

4.4 Stärkegelelektrophorese

4.5 Quantitative Bestimmung von Hb F

4.6 Spektralanalyse des sauren Methämoglobinderivates

4.7 Hitzedenaturierung

4.8 Innenkörperbildungstest

4.9 Chromatographische Auftrennung mittels Anionenaustauscher

5.0 Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen

6.0 Diskussion

7.0 Zusammenfassung

8.0 Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1.0 E I N F Ü H R U N G:

1.1 Historischer Überblick:

Die Erforschung des roten Blutfarbstoffes, des Hämoglobins (Hb), erfolgte hauptsächlich in den letzten Jahrzehnten. Zwar berichtete KÖRBER (26) 1866 in seiner Inauguraldissertation in Dorpat über den Nachweis eines Hämoglobins im Nabelschnurblut Neugeborener, welches er Hb F nannte. Doch erst nahezu 100 Jahre später sollte die eigentliche Aufklärung der Fragen um das Hämoglobin erfolgen. 1948 beschrieben HÖRLEIN und WEBER (18) ein weiteres Hämoglobin, das Hb M und 1949 gelang PAULING, ITANO, SINGER und WELLS (38) der Nachweis des Hb S. In der Zeit von 1956 - 59 erbrachte INGRAM (22, 23, 24, 25) den Beweis für die molekulare Strukturabweichung und lokalisierte die Veränderungen im Hb S - Molekül. 1960 konnte PERUTZ (40) die Tertiär und Quartärstruktur des normalen Hämoglobinmoleküls durch Röntgenstrukturanalyse aufklären und 1961 beschrieb BRAUNITZER et.al. (6) die Primärstruktur der einzelnen Hämoglobinketten.

Somit war der Bau des Hämoglobinmoleküls erkannt und der Entdeckung weiterer Hämoglobinvarianten der Weg geebnet.

1.2 Struktur und Vorkommen der normalen Hämoglobine:

Das Hämoglobinmolekül besteht aus 4 Hämgruppen und einem Eiweißkörper, dem Globin. Dieses wiederum setzt sich aus 2 Paaren jeweils identischer Polypeptidketten zusammen wobei jede Kette eine Hämgruppe enthält.

Im Laufe des Lebens treten beim Menschen drei verschiedene Hämoglobine auf: Hb A, Hb F, Hb A₂. Hb A besteht aus zwei alpha- und zwei beta- Ketten ($\alpha_2 \beta_2$), Hb F aus zwei alpha- und zwei gamma- Ketten ($\alpha_2 \gamma_2$) und Hb A₂ aus zwei alpha- und zwei delta- Ketten. ($\alpha_2 \delta_2$).

Während die α - Kette aus 141 Aminosäuren besteht, weisen die β -, γ -, δ -Ketten je 146 Aminosäuren auf. Das Hämoglobinmolekül besteht somit aus 674 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 64450.

Ein vierter Blutfarbstoff wurde noch in jungen Embryonen gefunden, das embryonale oder Primitiv-Hämoglobin. Hierbei sind epsilon-Ketten vorhanden, die mit alpha-Ketten verbunden sein können, und als Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) bekannt sind, oder diese epsilon-Ketten bilden ein Tetramer, welches dann Hb Gower I genannt wird (ϵ_4).

Die epsilon-Ketten findet man ausschließlich in bis zu drei Monaten alten Feten. Das Hb F ist das eigentliche fetale Hämoglobin, dessen Anteil bei der

Geburt noch 50-80% beträgt. Im Säuglingsalter fällt er sehr schnell ab und macht später nicht mehr als 1% aus. Hb A₂ entsteht in den ersten Lebensmonaten und beträgt normalerweise höchstens 3,5% des Gesamt-Hb. Der Hauptbestandteil des menschlichen Hämoglobins, nämlich ca. 97%, ist das Hb A.

Das Auftreten embryonaler, eines fetalen und adulter Hämoglobine steht in enger zeitlicher Beziehung zu den drei verschiedenen Phasen der Blutbildung. Das embryonale Hb ist der Blutfarbstoff der mesoblastischen Periode der Blutbildung, das fetale Hb tritt während der hepatischen Phase auf, während die adulten Hämoglobine vom Zeitpunkt der Umschaltung der Blutbildung von der hepatischen auf die medulläre Phase nachweisbar werden.

1.3 Die anomalen Hämoglobine:

Neben den bisher beschriebenen normalen Hämoglobinen gibt es eine Anzahl abnormer Varianten des Blutfarbstoffes, deren Ursache in einer Synthesestörung der Polypeptidketten liegt. Ein abnorm gebautes Häm als Ursache der Anomalie ist bisher nicht bekannt. Bei der Globinsynthesestörung kann die Bildung einer Polypeptidkette im Ganzen unterdrückt sein (Thalassämie). Eine Kette kann aber auch in ihrer Primärstruktur derart verändert sein, daß entweder ein Austausch von Aminosäuren vorliegt (Hb S), oder eine Aminosäure fehlt (Hb M Frei-

burg), oder eine neue Polypeptidkette aus Resten zweier verschiedener Ketten entsteht (Hb Lepore).

Hieraus ist ersichtlich, daß unter diesen Umständen eine große Anzahl von Hämoglobinanomalien möglich ist, die jedoch nicht alle zu einer Krankheit führen müssen. Man unterscheidet heute klinisch die Hämoglobinanomalien von den Hämoglobinopathien, wobei die letzteren mit Krankheitserscheinungen einhergehen.

1.4 Vorkommen der Hämoglobinanomalien:

Das Auftreten abnormer Hämoglobine im europäischen Raum ist nicht so selten wie man vielleicht annehmen möchte. So wies NOWICKI (37) in seinem Untersuchungsgut von 5400 Patienten 160 Fälle von Hämoglobinanomalien nach. Darunter waren 86 deutschstämmige Personen mit einer β -Thalassämia minor, ferner ein Fall mit einem bisher nicht näher klassifiziertem Hb M und eine deutsche Sippe mit einem anomalen Hämoglobin. SILVESTRONI und BIANCO (46) berichten über das Auftreten von Hb S in Italien, ebenso ist dessen Vorkommen in Griechenland gesichert (10). Hb C-Träger fand man unter anderen auch in der Schweiz (31), in Italien (39) und in Griechenland (12). Hb D ist in Deutschland als Hb D- β Frankfurt (32,33,36) in zwei Sippen aufgetreten; weitere Hb D-Träger leben in Italien (45). Auch das

Hb E wurde in Deutschland nachgewiesen (2), ebenso mehrere Fälle mit Hb M-Anomalien (4). Des weiteren hat PRIBILLA (42,43,44) das Hb Köln beschrieben, eine abnorme Hämoglobinkomponente, deren Struktur 1967 aufgeklärt wurde (8). Seit 1960 ist das Hb Zürich (17,16,1) bekannt, eine Hämoglobinanomalie mit sulfonamidinduzierter Innenkörperbildung.

Aus dieser kurzen Übersicht ist zu ersehen, daß die Hämoglobinanomalien in deutschen Sprachraum zwar selten sind, mit ihrem Auftreten jedoch gerechnet werden muß.

2.0 P R O B L E M S T E L L U N G:

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob das bei einem 28-jährigen deutschstämmigen Mann in der Medizinischen Universitätsklinik Gießen festgestellte Hämoglobin mit einem bereits beschriebenen und somit bekanntem anomalen Hämoglobin identisch ist, oder ob es sich hierbei um eine neue Hämoglobinanomalie handelt.

3.0 K A S U I S T I K:

Am 30. 5. 1967 wurde der damals 28-jährige Patient H.T., geboren am 17. 2. 39 mit den Zeichen eines hochgradigen Ikterus und erheblichen Oberbauchschmerzen in unserer Klinik aufgenommen.

Aus der Anamnese des Patienten war zu erfahren, daß er bisher niemals ernstlich erkrankt war, obwohl sein Urin seit seiner Kindheit dunkelbraun gefärbt ist. Im November 1966 verspürte er erstmals plötzlich heftige krampfartige Schmerzen im Oberbauch, die sich mehrmals wiederholten. Nach einem beschwerdefreiem Intervall von ca. 5 Monaten bekam er Mitte Mai 1967 erneut kolikartige Oberbauchbeschwerden. Einige Tage später wurde seine Hautfarbe intensiv gelb, worauf er in die Medizinische Universitätsklinik in Gießen eingeliefert wurde.

Die Familienanamnese des Pat. ist sehr aufschlußreich: Sein Vater leidet seit seiner Kindheit angeblich an einer "hämolytischen Anämie". In den letzten Jahren trat wiederholt eine Gelbsucht auf. Eine erhebliche Vergrößerung der Milz besteht seit langer Zeit. Der Urin ist ebenfalls auffallend dunkelbraun.

Die Mutter ist bis auf ein Hüftleiden gesund.

Eine Schwester des Patienten, Frau A.W., geb. am 17. 5. 1935 äußert die gleichen Beschwerden wie

der Patient. Sie hatte bisher dreimal einen Ikterus ungeklärter Ursache.

Ihre Tochter, E.W., geb. am 20. 10. 1954, litt unter den gleichen Symptomen bis ihr 1966 die 750 g schwere Milz entfernt wurde. Der histologische Befund erbrachte außer Ektasien der Sinus keine krankhaften Veränderungen. Seit dieser Zeit ist das Kind angeblich erscheinungs- und beschwerdefrei.

Bei einem Bruder des Patienten, Th.T., geb. am 24. 8. 1943, wurden auch intermittierende ikterische Schübe festgestellt. Ihm wurde ebenfalls die stark vergrößerte Milz entfernt. Seit dieser Zeit ist er fast völlig beschwerdefrei.

Drei weitere Geschwister sind gesund.

Besonders erwähnenswert ist noch, daß die Familie deutschen Ursprungs ist.

Bei der Aufnahme war die Haut des Patienten intensiv gelb verfärbt. Die kolikartigen Oberbauchbeschwerden hatten inzwischen nachgelassen, jedoch bestand noch eine Druckschmerzhaftigkeit unterhalb des rechten Rippenbogens. Die Leber war nicht testbar, die Milz dagegen deutlich vergrößert, druckschmerzhaft und hart. Der untere Pol stand etwa 8 cm unter dem linken Rippenbogenrand.

Die Laborbefunde bei der Aufnahme betrugen in Einzelnen:

Gesamtbilirubin : 12,60 mg%
Bilirubinester : 6,95 mg/%
SGOT : 150 mE
SGPT : 112 mE
Gesamt-LDH : 637,0 I.E.
LDH-Isoenzyme : I 218,4 I.E.
II 282,1 I.E.
III 81,9 I.E.
IV 27,3 I.E.
V 27,3 I.E.

alk. Phosphatase : 62 m.E.

Der Eisengehalt des Serums war mit 148 $\gamma\%$ gering erhöht, der Kupfergehalt lag mit 124 $\gamma\%$ im Normbereich. Die wiederholt durchgeführten Serunelektrophoresen zeigten keine Abnormitäten, das Gesamteiweiß betrug 7,45 g%. Auch waren der Harnstoff, die Harnsäure, die Na-, K-, Ca- Werte normal.

Die hämatologischen Untersuchungen ergaben folgenden Befund:

Hb 14,4 g%, Erythrocyten 4,44 Mio, Hb_E 32,5, Proerythrocyten 158⁰/oo, Leukozyten 5300, Thrombo-
cyten 88000. Die Erythrocyten waren vereinzelt basophil getüpfelt.

Im Urin waren Bilirubin und Urobilinogen in Kälte und Wärme positiv, Urobilin negativ.

Nach 6 Tagen betrugen:

Gesamtbilirubin : 3,72 mg%
Bilirubinester : 1,73 mg%
SGOT : 54,0 m.E.
SGPT : 85,0 m.E.
alk. Phosphatase : 59,6 m.E.

Hb 13,0 g%, Erythrocyten 4,25 Mio, Hb_E 30,6 ,
Proerythrocyten 157⁰/oo, Leukocyten 4500.

Die Erythrocytenresistenzbestimmung lag im Normbereich.

Nach 12 Tagen waren der Gesamtbilirubingehalt mit 3,03 mg% und der Bilirubinester mit 0,71 mg% noch erhöht, die SGOT betrug noch 9,0 m.E., die SGPT 4,5 m.E.

Eine Kontrastmitteldarstellung der Gallenblase ergab keinen Anhalt für das Vorliegen von Konkrementen.

Bei der histologischen Untersuchung eines Leberpunktates fand man bei erhaltener Läppchenstruktur einige Gallezylinder, eine geringe Gallepigmentspeicherung der Zellen, sowie eine auffallende Ansammlung von lipofuscinartigem Pigment in den leberläppchenzentralen Anteilen.

Die Auswertung eines Sternalpunktates ergab eine hochgradige Hyperplasie der Erythropoese.

Das Befinden des Pat. besserte sich rasch, sodaß er nach 16 Tagen in nahezu beschwerdefreiem Zustand

entlassen werden konnte. Wiederholte Kontrolluntersuchungen der Transaminasen und des Bilirubingehaltes im Serum, sowie des Blutbildes zeigten keine pathologischen Befunde. Der Patient hat bis heute keinen erneuten Ikterus mehr bekommen; er fühlt sich wohl und ist voll arbeitsfähig.

Der Verdacht, daß es sich bei diesem Krankheitsbild neben der beschriebenen Cholestase um eine Hämoglobinsynthesestörung handeln könnte, verstärkte sich noch, als man bei einer Auftrennung des Hämoglobins im Stärkeblock eine zusätzliche Fraktion fand.

4.0 M A T E R I A L und M E T H O D E N:

4.1 Blutentnahme und Aufbewahrung:

Das Blut des Probanden wurde für alle Untersuchungen in 3,8% Na- Citrat- Lösung aufgenommen und sofort bei 0° - 4° C verarbeitet.

4.2 Herstellung der Hb- Lösung:

Das Citratblut (1:10) wird 3- mal in 0,9% NaCl- Lösung gewaschen und jeweils 10 min bei ca. 2700 Upm zentrifugiert. Das so gewonnene Erythrocytensediment wird durch Zufügen des 3- fachen Volumens aqua dest. hämolysiert. Zu 10 ml Hämolysat werden 0,05 ml einer frisch zubereiteten 5% KCN- Lösung hinzugegeben, um etwa vorhandenes Hämoglobin in das stabilere Cyan- hämoglobin zu überführen. Nun wird dieses Hämolysat mit 1 ml CCl_4 kräftig ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Hierbei setzen sich die Erythrocytenstromata und ein Teil des Nicht- Hämprotein (NHP) in einer Schicht über dem CCl_4 ab. Die über dieser Zellrestschicht sich befindende Hämoglobinlösung wird nun abpipettiert. Sie ist bei 0° - 4° C ca. 14 Tage lang haltbar, ohne merklich zu denaturieren. (30). Eine so präparierte Hb- Lösung bezeichnet man als "konzentrierte Hb- Lösung" (34).

4.3 Stärkeblockelektrophorese:

Dieses Verfahren, von KUNKEL und WALLENIUS (29) entwickelt, von KÜNZER und AMBS als Hochspannungselektrophorese (27,28) modifiziert, ist zur quantitativen Bestimmung der Hb- Fraktionen geeignet. Es ist häufig die erste Untersuchung zur Charakterisierung von Hb- Anomlien. Bei meinen Untersuchungen benutzte ich die von WIELAND und PFLEIDERER entwickelte Hochspannungselektrophorese- Apparatur (Pherograph - Original - Frankfurt, Typ 64, nach Wieland und Pfleiderer; Hersteller: Hormuth und Vetter, Heidelberg-Wiesloch) mit horizontaler Trennebene.

Auf die mit Kühlmittel (-5°C) direkt in Kontakt stehende Glasplatte der Elektrophoreseapparatur wird der Stärkeblock in einem Kunststoffrahmen (20cm x 30cm) gegossen. Hierfür verrührt man Kartoffelstärke (Amylum solubile "Merck") mit einem Fließmittel zu einem zähfließenden Brei. Als Fließmittel verwendet man Veronalpuffer (0,1m, pH 8,6 : 54 g Veronal + 120 ml 2n NaOH mit H_2O auf 1000 ml auffüllen und bis zur vollständigen Auflösung des Veronals auf 100°C erhitzen; dann mit H_2O auf 10000 ml auffüllen). Mit diesem Brei wird der Kunststoffrahmen gleichmäßig ca. 5 mm hoch ausgefüllt und mit Filterpapier das überschüssige Fließmittel aufgesaugt. Die zu untersuchenden Hb- Lösungen werden ca. 7 cm vom kathodennahen Ende entfernt strichför-

mig mit der Pipette aufgetragen (0,025 ml auf 2,5 cm). Nun werden die Elektroden (mit Dialysiermembran umhüllte Leinwandstreifen) auf die beiden Enden des Stärkeblocks fest aufgelegt und mit einer Glasplatte beschwert, um einen engen Kontakt zwischen Stärkeblock und Elektroden zu erreichen. Die elektrophoretische Auftrennung ist nach 6 -8 Stunden bei einer Feldstärke von 40 V/cm und einer Stromstärke von 40 mA beendet. Nach Ausstechen der einzelnen Banden (Hb- Fraktionen) werden diese in ein Zentrifugengläschen mit jeweils 6 ml aqua dest. gebracht. Für den Leerwert wird ein gleichgroßes Hb- freies Stück aus dem Stärkeblock ausgestochen und ebenso wie die Hb- Fraktionen behandelt. Die Stärkesuspension wird in den Gläschen aufgeschüttelt; in der Kühlzentrifuge wird anschließend die Stärke von dem Überstand, der die Hb- Fraktionen enthält, nach 20 min bei 4000 Upm getrennt. Der abgehobene Überstand wird - falls noch eine Trübung besteht - erneut scharf zentrifugiert. Die Extinktion der Eluate wird gegen den Leerwert bei 420 m μ am Spektralphotometer (Carl Zeiss PM QII) gemessen. Als Bezugswert zur Berechnung des prozentualen Anteils der einzelnen Hb- Fraktionen dient die wässrig verdünnte Ausgangs-Hb- Lösung (0,025 ml + 6 ml H₂O = 100%).

4.4 Stärkegelelektrophorese: mit diskontinuierlichem Puffersystem (41)

Diese Untersuchungsmethode ist zur qualitativen Analyse von Hb- Lösungen gut geeignet, da sie eine scharfe Auftrennung der einzelnen Hb- Fraktionen ergibt. Entwickelt wurde dieses Verfahren von SMITHIES (48,49 verg. auch 11); zur Hb- Analyse wurde es von GOLDBERG und ROSS (14) modifiziert.

Hydrolysierte Stärke (Connaught Medical Research Laboratories, Toronto, Canada) wird mit 0,015 m Boratpuffer (0,928 g H_3BO_3 auf 1000 ml H_2O , mit 3 ml 2 n NaOH auf einem pH von 8,6 eingestellt) in einem Rundkolben aufgeschwemmt (30 g Stärke auf 200 ml Puffer) und über einem Bunsenbrenner unter kräftigem Schütteln solange erhitzt, bis die Stärke in die Gelform übergeführt ist. Dann werden mittels einer Wasserstrahlpumpe und Reitmayr-Aufsatz die Luftblasen entfernt und das flüssige Gel in eine Kunststoffschale gegossen, die vorher mit paraffinum liquidum ausgestrichen wird. Die nun erstarrende Stärkelösung wird mit einer Paraffinschicht (Erstarrungspunkt: $42-44^{\circ}C$) überzogen und zur "Reifung" 10-12 Stunden im Kühlschrank bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Erst dann ist das Gel verwendbar; seine Ausmaße betragen 7 cm x 29 cm x 0,6 cm. Nach Entfernen der Paraffinschicht wird das Gel 7 cm vom kathodennahen Ende quer eingeschnitten. In diesen Schlitz werden 1,5 cm lange und 3 mm hohe Filterpapierstreifen (Schleicher und Schüll 2043b) ge-

steckt, die vorher mit den zu untersuchenden Hb-Lösungen getränkt wurden. Das Gel wird nun erneut mit einer Paraffinschicht überzogen, mit Ausnahme der für die Auflage der Elektroden bestimmten Enden. Die elektrophoretische Trennung dauert 4 - 6 Stunden bei einer Feldstärke von 25 V/cm, einer Stromstärke von 25 mA und einer Kühltemperatur von -5°C . Als Elektrodenpuffer wird nicht der zur Gelherstellung verwendete, sondern ein 0,09 M Boratpuffer (pH 8,6) benutzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die Paraffinschicht entfernt, das Gel aus der Kunststoffschale herausgenommen und mit einem Messer in 2 gleiche Schichten aufgeschnitten. Es hat sich gezeigt, daß die Auftrennung im Inneren des Gels schärfer ist. Auch hat man die Möglichkeit - durch die beiden Schnitthälften - mehrere Färbemethoden zur Anwendung zu bringen. Das Anfärben der Hb-Fraktionen erfolgt durch Einlegen der Gelschnitte für 20 min in 0,5% Lösung von Amidoschwarz (10 B "Merck") in Eisessig - Methanol (1:8). Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen werden die Schnitte dann in ein Gemisch aus Eisessig - Methanol - Wasser (1:4:5) eingelegt. Nach mehrmaligen Erneuern dieses Entfärbegemisches innerhalb 24 Stunden sind die Gelschnitte soweit entfärbt, daß nur noch die Hb-Banden deutlich blau hervortreten. Eine andere Möglichkeit zur Darstellung der Hb-Banden besteht im Anfärben des Proteinanteils des Hb-Mo-

leküls mit Dianisidin. Hierzu löst man 250 mg Dianisidin in 175 ml Äthanol. Zu 160 ml dieser Dianisidinlösung setzt man 40 ml eines 0,1 m Acetatpuffers (pH 4,6) und 8 ml 30% H_2O_2 zu und füllt mit 60 ml H_2O auf. Nach 30 minütigem Anfärben der Gelschnitte werden diese 10 min lang mit einem Gemisch von Eisessig-Methanol-Wasser (1:4:5) wieder entfärbt und in einem Wasser-Glycerin-Gemisch (1:1) aufbewahrt. Die Hb- Banden treten hierbei kräftig braun gefärbt hervor, das übrige Gel erscheint weiß.

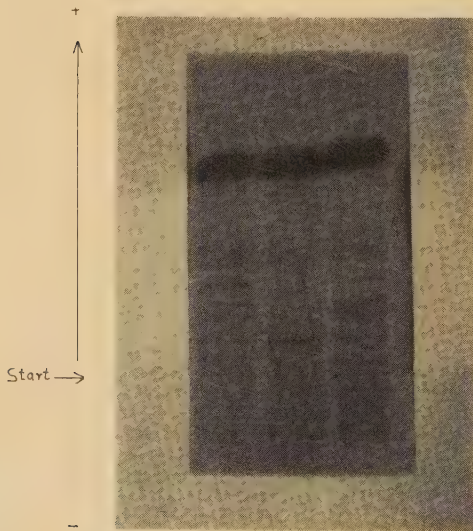


Abb. 1: Auftrennung von menschlichem Serum in seine Eiweißkomponenten.

Abb. 1 veranschaulicht die hervorragende Trennfähigkeit des Stärkegels. Hier wurde bei der Elektrophorese menschliches Serum in seine verschiedenen Eiweißfraktionen aufgetrennt und mit einer Amidoschwarzfärbung sichtbar gemacht.

4.5 Quantitative Bestimmung von Hb F:

Hierfür wurde die von BETKE und Mitarb. (5) angegebene Modifikation der Methode nach SINGER und Mitarb. (47) angewandt. Sie beruht auf der Tatsache, daß Hb F durch NaOH etwa 100 x langsamer denaturiert wird als Hb A und Hb A₂.

Aus einer konzentrierten Hb- Lösung wird durch Verdünnen mit einer 0,02% $K_3[Fe(CN)_6]$ - KCN - Lösung (0,2 g $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0,2 g KCN auf 1000 ml aqua dest.) eine etwa 0,5% Cyanhämiglobinlösung hergestellt. Zu 2,8 ml dieser Lösung werden im Wasserbad bei 20°C 0,2 ml einer 1,2 n NaOH zugefügt. Der dabei ablaufende Denaturierungsprozess wird nach genau 2 min durch rasche Zugabe von 2 ml einer 100% gesättigten Ammonsulfatlösung unterbrochen. Dadurch präzipitiert das denaturierte Material; es wird anschließend durch ein Doppelfilter (Schleicher und Schüll Nr. 587 E und Nr. 1575) abgefiltert. Das nicht denaturierte Cyanhämiglobin bleibt im Filtrat; seine Konzentration wird am Spektralphotometer (Fa. Carl Zeiss) bei 540 mμ gemessen. Zur Bestimmung der Aus-

gangskonzentration werden. 0,4 ml der Cyanhämioglobinlösung mit 6,75 ml aqua dest. verdünnt. Diese Lösung hat eine 10-fach stärkere Verdünnung als der Ansatz. Sie wird ebenfalls bei 540 mμ gemessen. Aus diesen beiden Extinktionswerten kann der Hb F-Gehalt direkt in % errechnet werden nach der Formel:

$$\frac{\text{Extinktion des Filtrats}}{\text{Extinktion der Kontrollösung}} \times 10 = \% \text{ Hb F}$$

Die Normalwerte für gesunde Erwachsene liegen zwischen 0,4 % und 1,0 %.

4.6 Spektralanalyse:

Die spektrophotometrische Untersuchung des sauren Methämoglobinderivates wurde nach den Angaben von CARRELL, LEHMANN und PRIBILLA (8) durchgeführt. Das Ziel dieser Bestimmungen war, festzustellen, ob eine Ähnlichkeit zwischen dem Hb unseres Patienten und dem Hb Köln vorliegt.

Die Hb- Lösungen wurden ohne KCN-Zusatz hergestellt, das heißt, es wurden immer Met-Hb-Lösungen (ca. 0,1%) untersucht.

Zu 50 ml eines 0,01 m Phosphatpuffers mit einem pH von 5,5 wird ein Tropfen einer 5% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösung zugesetzt. 4 ml dieses Gemisches werden mit 2 Tropfen der zu untersuchenden Hb- Lösung kräftig geschüttelt.

Nach 15 min erfolgt die Absorptionsmessung im Spektralphotometer (Carl Zeiss PM QII) im Bereich zwischen 400 und 700 m μ .

4.7 Hitzedenaturierung:

Dieses Verfahren zur Abtrennung thermolabiler Hb-Varianten wurde - wie beim Hb- Köln (8) - nach einer Modifikation von GRIMES, MEISLER und DACIE (15) angewandt.

Die etwa 10 g% Hb- Lösung wird mit 0,03 m Na- Phosphat-Puffer (pH 7,0) gemischt (1 ml Hb- Lösung + 5 ml Puffer) und für 60 min in ein Wasserbad von 50°C gestellt. Ist thermolabiles Material in der Hb- Lösung vorhanden, so fällt es aus. Nach Abzentrifugieren (15 min bei 3000 Upm) wird der Überstand abpipettiert. In ihm und in der Ausgangs-Hb-Lösung wird die Hb- Konzentration bei 540 m μ am Spektralphotometer gemessen. Zum Vergleich werden Hb- Lösungen von Normalpersonen untersucht.

4.8 Innenkörperbildungstest:

Diese Untersuchungen wurden in Anlehnung an die von BEUTLER, DERN und ALVING (7) angegebene Methode mit Phenylhydrazin durchgeführt, von uns aber auch zur Erfassung von sulfonamidinduzierten Innenkörpern modifiziert. Auf diese Weise wollten wir feststellen, ob zwischen der untersuchten anomalen Hb- Variante und dem Hb Zürich eine Ähnlichkeit besteht.

Von 6 Reagenzgläschen, die jeweils 3 ml frisches Citratblut (1:10) enthalten, werden 4 Gläschen Sulfonamidlösungen zugesetzt; die beiden anderen werden als Leer- und Kontrollversuch verwendet, indem zum Leerversuch (Röhrchen-Nr. I) 1,5 ml physiol. NaCl-Lösung und zum Kontrollversuch (Röhrchen-Nr. VI) 1,5 ml 1% β -Acetylphenylhydrazinlösung zugesetzt werden. In die Röhrchen -Nr. II - IV werden Lösungen der vom Hb Zürich her als hämolyseauslösend bekannten Sulfonamide "Gantrisin"^R und "Madribon"^R (13), sowie "Durenat"^R und "Sulfuno"^R pipettiert. In Röhrchen -Nr. II werden 0,07 mg "Durenat", in Röhrchen Nr. III 0,2 mg "Gantrisin", in Röhrchen -Nr. IV 0,07 mg "Madribon" und in Röhrchen - Nr. V 0,07 mg "Sulfuno" gegeben. Diese Sulfonamidmengen sind in jeweils 1,5 ml 0,9% NaCl gelöst. Zur Herstellung der 1% β -Acetylphenylhydrazinlösung werden 1 g dieser Substanz in einer Mischung aus 88 ml isotonischer Phosphatpufferlösung ($4,404 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 + 18,545 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ in 1000 ml aqua dest., pH 7,4) und 12 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgelöst. Die so beschickten Reagenzgläschen werden für 2 Stunden in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Nach einer und nach zwei Stunden werden jeweils 1-2 Tr. des inkubierten Citratblutes auf einem mit 0,5% Nilblausulfatlösung (gelöst in abs. Alkohol) gefärbten Objektträger gebracht, mit einem Deckgläschen versehen und für 30 min bei 37°C in eine feuchte Kammer gestellt.

Dann werden Ausstriche angefertigt und diese mikroskopisch ausgewertet.

Diese Versuchsreihe wurde wiederholt mit Citratblut des Probanden und Normalfällen durchgeführt.

4.9 Chromatographische Auftrennung mittels Anionenaustauscher:

T.H.J. HUISMAN (19) empfiehlt in seiner Arbeit "Normal and abnormal human hemoglobins" auch die chromatographische Auftrennung auf Anionenaustauscher zur Charakterisierung und quantitativen Bestimmung von neuem Hämoglobin. Dieses Verfahren, vielfach abgeändert, wurde bei unseren Versuchen in enger Anlehnung an die von NOWICKI (37) angegebene Modifikation durchgeführt.

a. Aufbereitung des Austauschers: Bei diesen chromatographischen Untersuchungen wurde als Anionenaustauscher QAE Sephadex A 50 (Pharmacia fine chemicals, Uppsala, Sweden) benutzt.

Zunächst läßt man das Sephadex (12,0 g auf 1000 ml) 48 Stunden in aqua dest. aufquellen und wäscht es dann auf einer Nutsche mit 0,5 n NaOH aus (auf 400 ml Sephadexvolumen 1000 ml 0,5 n NaOH) bis keine Chloride in dem Waschmedium mehr nachweisbar sind. Überschüssige NaOH entfernt man durch wiederholtes Nachspülen mit aqua dest. Da die spätere chromatographische Auftrennung mittels eines NaCl-Gradienten erfolgt, wird das Sephadexmaterial anschließend mit 1000 ml 0,5 n HCl

behandelt und der Säureüberschuß mit aqua dest. entfernt. Das so vorbereitete Sephadex wird dann mit dem Elutionspuffer (s.u.) mehrmals gewaschen und anschließend für 24 Stunden in dieser Pufferlösung, die mehrmals erneuert wird, aufbewahrt. Um die Glassäule zu füllen, muß vorher mittels einer Wasserstrahlpumpe die im Sephadex vorhandene Luft entfernt werden; auch muß dafür gesorgt werden, daß der pH-Wert in der Sephadexaufschwemmung 9,0 beträgt.

- b. Elutionsmittel: Als Elutionspuffer benutzten wir einen 0,33 n Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 9,0. Die Auftrennung der Hb- Fraktionen erfolgte mittels eines von 0 bis zu einer Ionenstärke von 0,3 linear ansteigenden NaCl-Gradienten. Hierfür diente eine Apparatur aus 2 gleichen, miteinander kommunizierenden Gefäßen, die in gleicher Höhe aufgestellt waren. Diese Gefäße, die in Bodenhöhe einen Auslaufstutzen haben, sind durch 2 PVC-Schläuche und ein Glasröhrchen miteinander verbunden. Beide Glasflaschen werden mit dem Elutionspuffer gefüllt (jeweils 500 ml), die PVC-Schläuche anschließend abgeklemmt (Schlauchklemmen). In einem der beiden Gefäße (Zulaufgefäß) wird eine 0,3 n NaCl-Konzentration (=Ionenstärke von 0,3) hergestellt und der dadurch etwas verschobene pH-Wert mit 1-2 Tropfen 2 n NaOH genau auf 9,0 justiert (pH-Meter: Radiometer Copenhagen).

- c. Füllen der Säule: Die Glassäule, wir arbeiten mit dem Chromatographierohr K 25/45 der Fa. Pharmacia, Uppsala, Sweden, wird an einem Stativ senkrecht angebracht. Die Säule wurde bei unseren Versuchen 40 cm hoch mit Sephadex gefüllt, was einem Volumen von 196 cm^3 bei einem Säulenquerschnitt von $4,89 \text{ cm}^2$ entspricht. Die entgaste Gelaufschwemmung läßt man langsam und kontinuierlich in das mit Elutionspuffer gefüllte Rohr fließen, wobei der Abflußhahn geöffnet ist. Es ist darauf zu achten, daß das Füllen nicht unterbrochen wird, da sich sonst Schichten unterschiedlicher Sephadexpartikeldichte bilden, die eine scharfe Auftrennung verhindern können. Auch ist es sehr wichtig, daß das gefüllte Chromatographierohr luftdicht verschlossen ist. Zur vollständigen Äquilibration wird die gefüllte Säule mit Elutionspuffer (5-faches Säulenvolumen) durchgespült.
- d. Präparation des Untersuchungsmaterials: Das Hämolysat, hergestellt wie weiter oben beschrieben, wird vor dem Auftragen 30 min bei 18000 Upm zentrifugiert, um weitgehend jede Beimengung von Denaturierungsprodukten zu vermeiden. Anschließend wird es mit 0,15 M Phosphatpuffer pH 9,0 im Verhältniss 1:1 versetzt. 5 ml dieser Lösung werden nun langsam und gleichmäßig auf das Gelbett aufgetragen. Auch hier muß vermieden werden, daß Luft in das Chromatographiesystem eindringt.

e. Elution, Registrierung und Sammeln der Eluate: Zu Beginn der Elution werden die Schlauchklemmen an beiden Gefäßen der Gradientenapparatur geöffnet. Ein Magnetrührer im Gradientenmischgefäß sorgt für eine gute Mischung der aus dem Zulaufgefäß hinzufließenden NaCl-Lösung mit dem Elutionspuffer. Somit wird im Gradientenmischgefäß eine linear ansteigende NaCl-Konzentration erreicht. Mittels einer Mikropumpe (LKB, Miniflow 4501) wird aus diesem Gefäß das Elutionsmittel auf die Säule gebracht. Die Durchflußgeschwindigkeit in der Säule ist nach wenigen Minuten konstant, da sich zwischen Zu- und Ablauf der luftdicht verschlossenen Säule bald ein Gleichgewicht einstellt. Bei unseren Versuchen betrug sie $4 \text{ ml/cm}^2/\text{Stunde}$. Das von der Säule kommende Eluat durchläuft ein UV-Durchflußphotometer (LKB, Uvicord 4701 A). Hier wird bei einer Wellenlänge von $253,7 \text{ m}\mu$ die Absorption gemessen und durch einen Zweifarbenpunktschreiber in Kurvenform registriert. Dieses Gerät ist gleichzeitig mit einem Fraktionssammler verbunden, der auf einen Fraktionswechsel von 20 min eingestellt wird und diesen auch auf dem Schreiber markiert.

5.0 ER G E B N I S S E:

1. Die hochspannungselektrophoretische Auftrennung des Hämolysates unseres Probanden, H.T., im Stärkeblock gab den eigentlichen Anstoß zur näheren Untersuchung dieses Hämoglobins.

Es zeigt sich nämlich, daß dabei eine Hämoglobinfraction auftrat, die bei Hämolysaten gesunder Menschen nicht zu sehen ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit des neuen Hämoglobins liegt zwischen der Hb A- Fraktion und der Hb A₂- Fraktion.

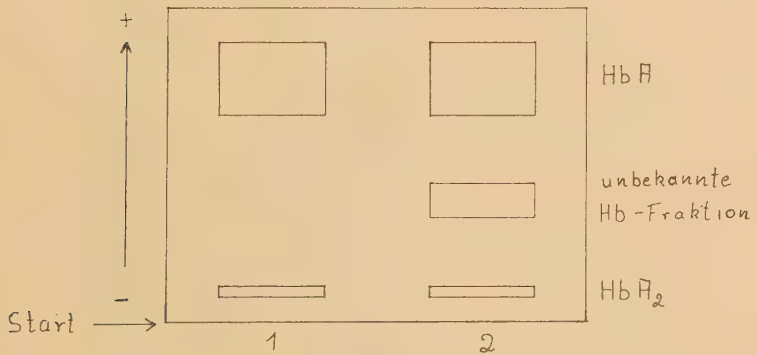


Abb. 2: Schematische Darstellung des elektrophoretisch aufgetrennten Hämolysates eines gesunden Menschen (1) und unseres Probanden (2).

Die wiederholt durchgeführten quantitativen Bestimmungen des Hämoglobingehaltes, durch Ausstechen der einzelnen Fraktionen aus dem Stärkeblock, ergaben für unseren Probanden folgende Werte:

Hb A₂ : 2,0% - 3,0% (Mittelwert : 2,5%)
Anomales Hb : 7,3% - 7,9% (Mittelwert : 7,6%)

Der Rest war Hb A und Hb F, wobei jedoch zu bemerken ist, daß die Hb F-Fraktion wegen des geringen Hämoglobingehaltes bei dieser Methode nicht zur Darstellung kam. Der Gehalt an Hb F wurde mittels Alkalidenaturierung bestimmt (s.u.).

Die anomale Hämoglobinfraction ist auch bei der Hämolysatauftrennung des Bruders unseres Probanden, Th.T., im Stärkeblock nachweisbar. Hier betrug der Hämoglobingehalt der einzelnen Fraktionen im Mittelwert:

Hb A₂ : 2,2%
anomales Hb : 7,1%

Eine schärfere Darstellung der einzelnen Hämoglobinfractionen war mit der Stärkegelelektrophorese möglich. Vordringlich wandten wir dieses Verfahren an, um die Lage und die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit des anomalen Hämoglobins näher zu bestimmen.

Zuerst stellten wir einen Vergleich zwischen der anomalen Hb- Fraktion und Hb F an, indem wir in einem Gel Hämolysat unseres Probanden und eine Hb- Lösung aus Nabelschnurblut nebeneinander auftrugen. Dabei stellte sich heraus, daß die anomale Hb- Fraktion langsamer als Hb F wandert. Dies ist aus den folgenden Abbildungen deutlich zu ersehen.

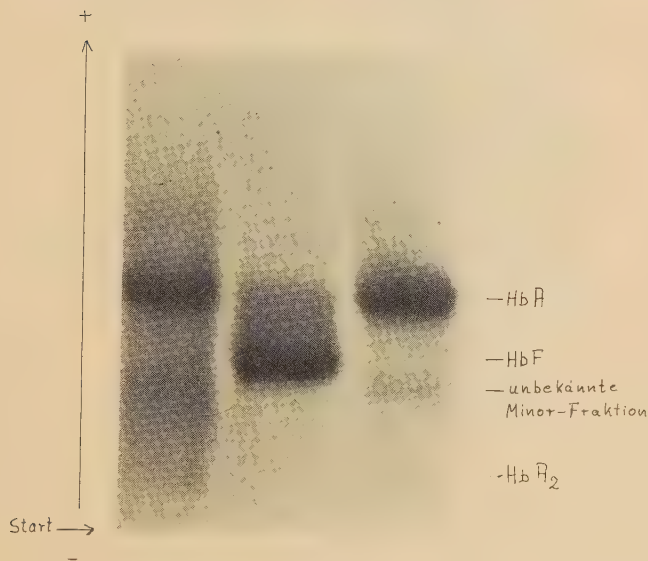


Abb. 3: Links und rechts ist die Lage der Hb- Fraktionen unseres Probanden zu sehen, in der Mitte die Hb- Banden aus Nabelschnurblut.

Bei vergleichenden Untersuchungen der Wanderungsgeschwindigkeit der anomalen Hb- Fraktion unseres Probanden mit der eines homozygoten Hb S zeigte sich, daß die Minorfraktion etwas schneller wandert als das Hb S.

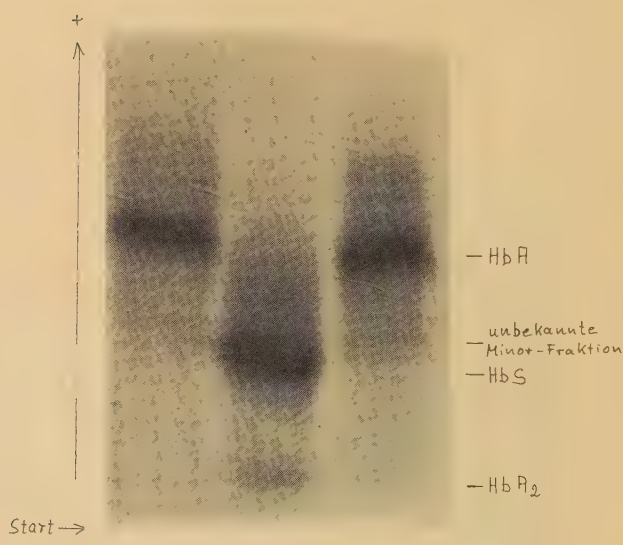


Abb. 4: Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit der anomalen Hb- Fraktion mit der des Hb S. Aus- sen wurde die Hb- Lösung unseres Probanden aufgebracht, in der Mitte homozygoten Hb S.

Um die Lage der anomalen Hb- Fraktion besser demonstrieren zu können, wurden die drei beschriebenen Hämogoblinlösungen in den nächsten Abbildungen nebeneinander aufgetragen. Die linke Seite der Bilder zeigt die mit Dianisidin angefärbten Gelhälften, während die rechte Seite mit Amidoschwarz gefärbte Gelschnitte darstellt.

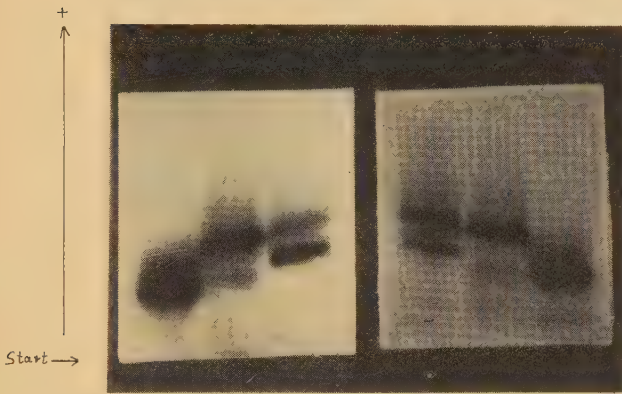


Abb. 5: Stärkegelelektrophorese: Aufgetragen wurden außen homozygote Hb S- Lösung, in der Mitte die Hb- Lösung des Probanden, innen ein Hämolyset aus Nabelschnurblut. Die linke Abbildung zeigt eine Dianisidinfärbung, die rechte eine Färbung mit Amidoschwarz.

Für die Nichtidentität der Banden wurde die Amidoschwarzfärbung zugrunde gelegt, da sie die Schwerpunkte der Banden wesentlich besser erkennen läßt als die Dianisidinfärbung. Aus Mangel an Hb- S- Lösung konnte ein Mischchromatogramm aus Hb- S und Probanden- Hb nicht angefertigt werden.

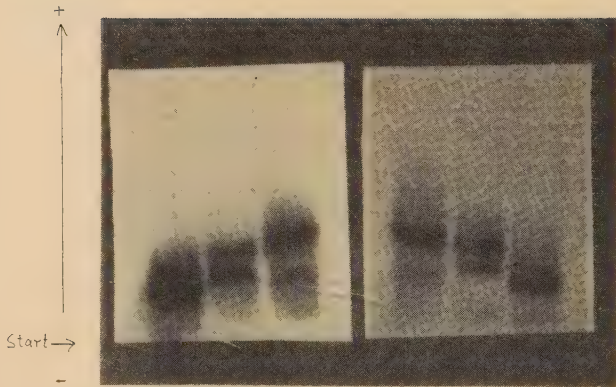


Abb. 6: Stärkegelelektrophorese: Hier wurde die Hb S-
Lösung außen, das Hämolysat aus Nabelschnurblut
in der Mitte und die Hb- Lösung des Pro-
banden innen aufgetragen. (Sonst wie Abb. 5).

3. Bei der quantitativen Bestimmung des Hb F Anteils
nach der von SINGER und Mitarb. (47) angegebenen
Methode wurden Werte zwischen 1,25% und 1,27% (Mittel-
wert : 1,26%) gefunden.

4. Die Spektralanalyse des Gesamthämoglobins nach CARELL, LEHMANN und PRIBILLA (8) ergab die in der Tabelle aufgeführten Extinktionswerte:

m μ	Proband	Vergleichsfall
700	0,102	0,100
690	0,105	0,105
680	0,106	0,107
670	0,125	0,122
660	0,161	0,160
650	0,240	0,244
640	0,346	0,352
630	0,383	0,388
620	0,351	0,355
610	0,316	0,320
600	0,300	0,315
590	0,345	0,351
580	0,422	0,428
570	0,440	0,443
560	0,422	0,445
550	0,530	0,542
540	0,615	0,645
530	0,645	0,678
520	0,690	0,725
510	0,755	0,800
500	0,795	0,840
490	0,755	0,802
480	0,710	0,762
470	0,700	0,755
460	0,734	0,792
450	0,795	0,850
440	1,030	1,057
430	1,800	1,820
420	2,400	2,400
410	2,450	2,450
400	2,500	2,500

In Kurvenform aufgezeichnet sieht dies folgendermaßen aus:

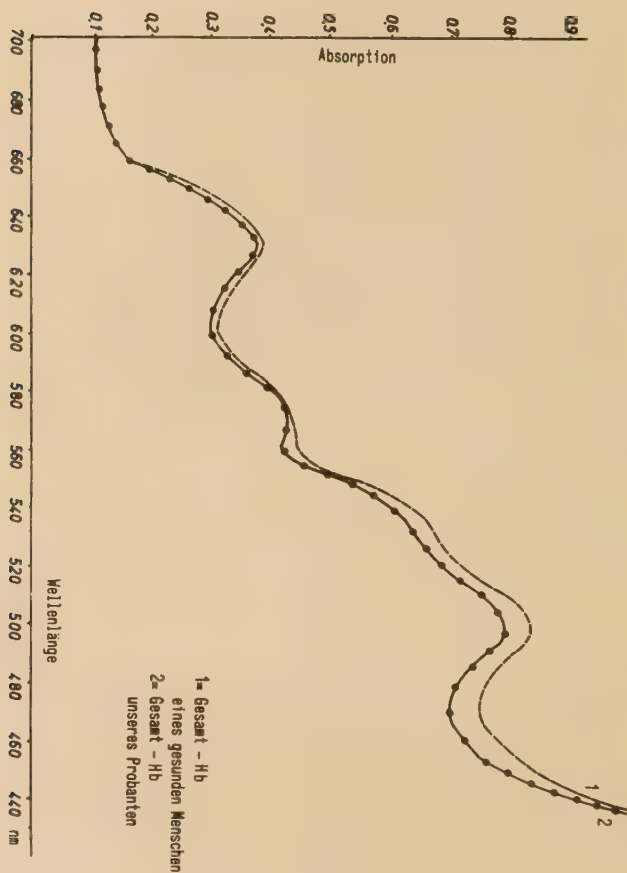


Abb. 7: Spektralkurve der Gesamthämoglobine unseres Propositus und eines gesunden Menschen.

Zum Vergleich ist der Verlauf der Spektralkurven des Hb A, des Hb Köln und des von NOWICKI (37) beschriebenen instabilen Hämoglobins dargestellt.

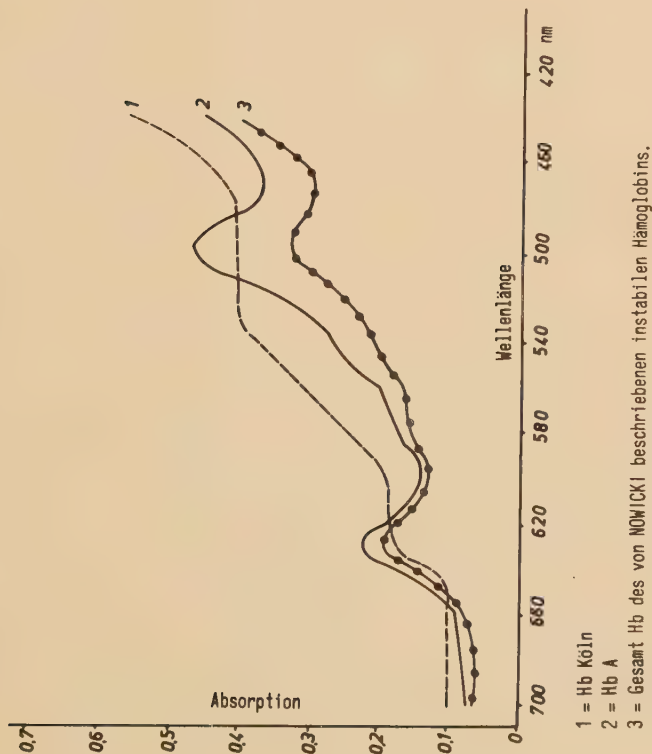


Abb. 8: Spektralkurven von 3 verschiedenen Hämoglobinen:

1. = Hb Köln (nach CARELL, LEHMANN und PRIBILLA)
2. = Hb A
3. = Gesamt-Hb des von NOWICKI beschriebenen instabilen Hämoglobins. (37).

5. Bei dem Versuch, thermolabile Hämoglobinfractionen abzutrennen, fand sich schon nach 30 Minuten eine deutlich sichtbare Präcipitatzmenge am Boden des Reagenzglases. Nach einer Stunde war der Niederschlag an denaturiertem Material noch größer.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, daß die Präzipitatbildung eingeschränkt werden kann, wenn die Hitzeinkubation der Hb- Lösung in vollständig gefüllten und luftdicht verschlossenen Gefäßen erfolgt. NOWICKI (37) kann in seiner Arbeit ein gleiches Verhalten feststellen.

Die Bestimmung des Abfalles der Hämoglobinkonzentration zwischen der Ausgangslösung und der inkubierten Hb- Lösung wurde am Spektralphotometer (Carl Zeiss PM Q II) bei 540 m μ durchgeführt. Der Konzentrationsabfall in den Hb-Lösungen unseres Probanden betrug nach 1 Stunde 8,9% - 11,8% (Mittelwert: 10,1%). Bei Vergleichsuntersuchungen mit Hb- Lösungen normaler gesunder Menschen fanden wir dagegen nur einen Abfall von 0,3% - 0,9% (Mittelwert: 0,5%):

6. Der Innenkörperbildungstest durch β -Acetylphenylhydrazin nach BEUTLER, DERN und ALVING (7) fiel bei unserem Probanden nicht pathologisch aus. Bei vergleichenden Untersuchungen mit Citratblut gesunder Menschen konnten keine bedeutsamen Unter-

schiede festgestellt werden.

Der prozentuale Anteil der Erythrocyten, die Innenkörper enthielten, war nach ein- und nach zweistündiger Inkubation annähernd gleich. In den Ausstrichpräparaten, die nach zwei Stunden angefertigt wurden, war nicht nur der Anteil an Erythrocyten mit Innenkörpern wesentlich höher, auch die Erythrocyten selbst enthielten vermehrt Innenkörper.

In allen Fällen wurde ein Abfall des reduzierten Glutathions von 19% - 26% und eine Verminderung der Hämoglobinkonzentration beobachtet.

In gleicher Weise wurde Citratblut des Probanden und einer gesunden Versuchsperson wiederholt mit Sulfonamidlösungen inkubiert. Dabei konnten wir weder eine Innenkörperbildung in den Erythrocyten, noch einen Abfall der Hämoglobinkonzentration und des reduzierten Glutathions feststellen.

Die beiden Abbildungen auf der nächsten Seite stellen Ausstriche dar, die nach zweistündiger Inkubation mit β - Acetylphenylhydrazin angefertigt wurden.

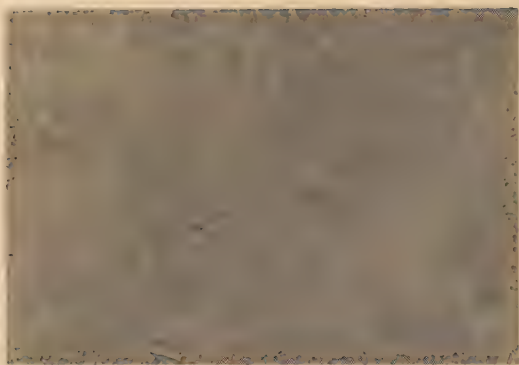


Abb. 9: Herstellung des Innenkörpers in den Erythrocyten ausseren Proteinden nach Inkubation mit β -Acetylphenylhydrazin.

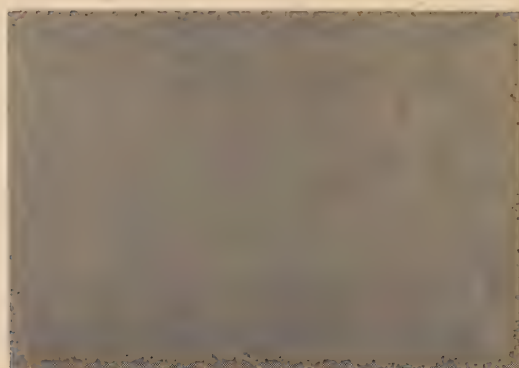


Abb. 10: Sie zeigt die Innenkörper in den Erythrocyten einer gesunden Vergleichsperson nach Inkubation mit β -Acetylphenylhydrazin. (Supravital-Färbung mit Nilblausulfat).

7. Die chromatographische Auftrennung der Hämoglobinlösung unseres Probanden mittels QAE-Sephadex-A-50 zeigte, wie auch bei der Stärkegelelektrophorese, daß neben den Hämoglobinfractionen Hb A und Hb A₂ eine zusätzliche Fraktion isolierbar ist.

Die folgende Abbildung stellt eine photographische Aufnahme dar, die ca. 6 Stunden nach Beginn der Auftrennung aufgenommen wurde. Dabei sind die einzelnen Hb- Fraktionen deutlich zu erkennen. Die Bande des anormalen Minor-Hämoglobins liegt zwischen der Hb A- und der Hb A₂- Fraktion.

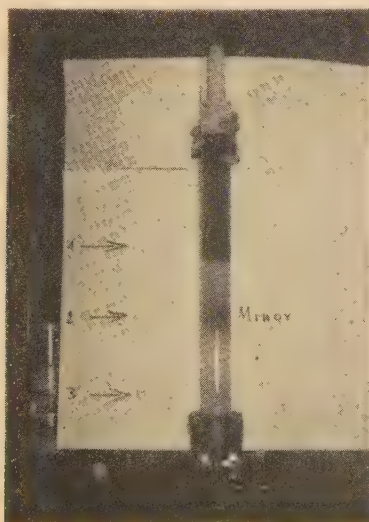


Abb. 11: Sie zeigt die einzelnen Hb- Fraktionen in der Sephadexsäule nach einer Trennzeit von ca. 6 Stunden. (1 = Hb A, 2 = Minor-Fraktion, 3 = Hb A₂).

Das nächste Bild zeigt die Absorptionskurve der chromatographischen Auftrennung.

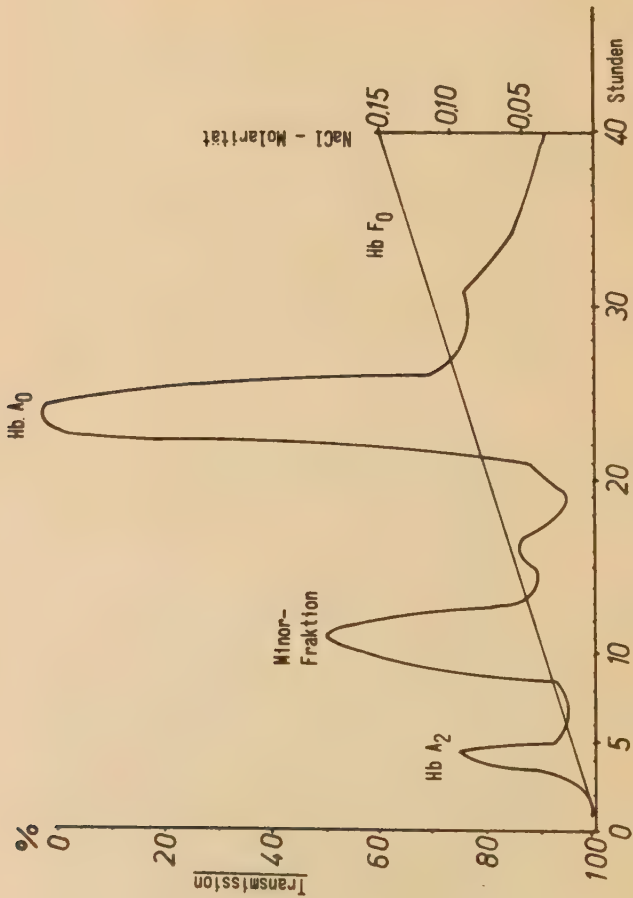


Abb. 12: Absorptionskurve des Gesamthämoglobins unseres Probanden, H.T.. Fraktionierung auf QAE-Sephadex. Elution mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten in 0,33 m Phosphatpuffer.

Dabei ist zu erkennen, daß der Hb A₂-Anteil zuerst eluiert wird, gefolgt von der Minor-Hämoglobinfraction. Sie ist von den angrenzenden Peaks deutlich abgesetzt. Anschließend erfolgt die Freisetzung des Hauptbestandteiles, nämlich Hb A, und zum Schluß erscheint im Blut der Hb F-Anteil.

Daß es sich bei den einzelnen Kurvenpeaks tatsächlich um die angegebenen Hb- Fraktionen handelt, konnte anhand der Stärkeblockelektrophorese nachgewiesen werden..

Zum Ausschluß einer nicht-sphärocytären hämolytischen Anämie, wurden die Erythrocytenenzyme unseres Probanden untersucht.

Die Werte betragen:

Hexokinase	1,9 I.E./10 ¹¹ Ery.
Pyruvatkinase	74,5 I.E./10 ¹¹ Ery.
Glucose -6- P-Dehydrogenase	23,0 I.E./10 ¹¹ Ery.
6-P-Gluconatdehydrogenase	21,2 I.E./10 ¹¹ Ery.
Glutathionreductase:	
NAD-H abhängig	22,2 I.E./10 ¹¹ Ery.
NADP-H abhängig	10,5 I.E./10 ¹¹ Ery.
Red. Glutathion	17,2
GSH-Stabilität	18%
ATP	21,9 µg%

Leider war es nicht möglich, die ganze Familie unseres Probanden zu untersuchen. Das Auftreten der anomalen Hämoglobinfraction konnten wir auch bei einer Schwester und bei einem Bruder des Pat. nachweisen.

6. DISKUSSION:

Hämoglobinanomalien konnten bisher im deutschen Sprachraum nur vereinzelt nachgewiesen werden. Ihr Auffinden ist häufig dem Zufall überlassen, da sie nur selten mit schweren Krankheitserscheinungen einhergehen. Auch ist die Identifizierung nur mit erheblichem methodischem Aufwand möglich.

BETKE (2) hat im "Haemoglobin-Colloquium" 1961 eine Zusammenfassung der Befunde von anomalen Hämoglobinen in Deutschland gegeben:

Zusammen mit HEILMEYER fand er in Baden-Württemberg eine Familie mit Hb E-Trägern. Weiterhin sind 2 Typen des Hb M bekannt, nämlich Hb M Leipzig und Hb M Freiburg. MARTIN und WÖRNER (31, 34) fanden zwei Familien mit Hb D, das nach Vorschlag von LEHMANN als Hb D β -Frankfurt bezeichnet wurde. Auch das Hb Zürich muß hierbei aufgezählt werden, da es in einer Familie auftrat, die zum deutschsprachigen Bevölkerungsanteil der Schweiz gehört. PRIBILLA und Mitarb. (42, 43, 44) berichteten von einer Familie am Niederrhein mit einem neuen Minor-Hämoglobin, das Hb Köln benannt wurde. Außerdem sind mehrere Fälle von Thalassämien in Deutschland bekannt.

Uns war es anhand der vorliegenden Untersuchungen gelungen, eine anomale Hämoglobinvariante ausfindig zu machen und näher zu beschreiben. Diese Hämoglobinanomalie ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

1. Bei der Stärkeblockelektrophorese findet man eine zusätzliche Fraktion, die bei einem pH von 8,6 zwischen der Hb A-Fraktion und der Hb A₂-Fraktion liegt.
2. Der prozentuale Anteil dieses anomalen Hämoglobins beträgt im Mittel 7,6% des Gesamthämoglobins, mit geringer Schwankungsbreite. Es handelt sich hierbei also um ein Minor-Hämoglobin.
3. Die Stärkegelelektrophorese läßt eine nähere Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit dieser unbekannten Fraktion zu. Bei einem pH von 8,6 wandert sie langsamer als Hb F, jedoch etwas schneller als Hb S.
4. Der Hb F-Anteil des Gesamthämoglobins beträgt im Mittel 1,26%, der des Hb A₂ 2,5%.
5. Die Spektralanalyse des Gesamthämoglobins zeigt keinen abweichenden Kurvenverlauf im Vergleich mit einer normalen Hämoglobinlösung.
6. Bei der Hitzdenaturierung findet man nach einer Stunde einen Abfall der Hämoglobinkonzentration von 10,1% im Vergleich zu einem Konzentrationsabfall von ca. 0,5% bei einer normalen Hämoglobinlösung.

7. Die Innenkörperbildung durch β -Acetylphenylhydrazin ist nicht vermehrt.
8. Der Abfall des reduzierten Glutathions im BEUTLER-Test beträgt 19% - 26%.
9. Eine Bildung von Innenkörpern durch Sulfonamide kann nicht gezeigt werden.
10. Bei der säulenchromatographischen Auftrennung des Gesamt-Hb mit QAE-A50-Sephadex kann man eine Hämoglobinfraction isolieren, die der neuen Fraction in Stärkegel und Stärkeblock entspricht.
11. Anhand der Ergebnisse der Erythrocytenenzymbestimmungen kann eine nicht-spärocytäre hämolytische Anämie ausgeschlossen werden.
12. Die anomale Hämoglobinfraction ist auch bei zwei Geschwistern des Probanden nachweisbar.

Nach CARELL, LEHMANN und PRIBILLA (8) ist mit einem häufigen Auftreten von Hb Köln zu rechnen. Es wurde von HUTCHINSON et al. (21) auch in einer schottischen Familie gefunden. 1966 konnten CARRELL, LEHMANN und HUTCHINSON (9) die Anomalie beim Hb Köln in der β -Kette lokalisieren. Hier ist in Position 98 Valin durch Methionin ersetzt. Hb Köln ist ein thermolabiles Minor-Hämoglobin, sein Anteil liegt unter 10% des Gesamt-Hb. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist im Stärkegel bei einem pH von 8,6 langsamer als die des Hb S. Bei der Spektralanalyse sind zwei deutliche Plateaubildungen im Kur-

venverlauf festzustellen (siehe Abb. 9). Außerdem sind bei der Hb-Köln-Krankheit im Blutausstrich Innenkörper spontan vorhanden.

Ein anderes pathologisches Hämoglobin, bei dem hämolytische Krisen durch exogene Noxen ausgelöst werden, ist das Hb Zürich. Es wurde von HITZIG und Mitar. (17) entdeckt, von HUISMANN (48) als β -anomal identifiziert. Beim Hb Zürich treten Hämolysen erst nach Gaben von Sulfonamiden auf. Dabei kommt es in den Erythrocyten zur Bildung von großen Innenkörpern. Hb Zürich macht 22% - 28% des Gesamt-Hb aus. Bei der Stärkegelelektrophorese kommt die anomale Fraktion zwischen Hb F und Hb S zur Darstellung. Nach Inkubation mit β -Acetylphenylhydrazin nach BEUTLER findet man eine stark vermehrte Innenkörperbildung in den Erythrocyten.

NOWICKI (37) beschreibt in seiner Habilitationsschrift eine neue thermolabile Hämoglobinanomalie, die 3% - 8% des Gesamthämoglobins ausmacht, und somit als Minor-Hb bezeichnet wird. Die anomale Fraktion wandert im Stärkegel bei pH 8,6 langsamer als Hb F und Hb S. Im Blutausstrich sind Innenkörper in den Erythrocyten der Erkrankten nachweisbar. Auffallend ist auch der relativ hohe Anteil an Hb F, nämlich 8%, sowie eine Hb A₂-Vermehrung.

Aus diesen Gegenüberstellungen ist zu ersehen, daß die von uns beschriebene Hämoglobinanomalie mit den oben aufgeführten Minor-Hämoglobinen nicht identisch sein kann.

Das Vorliegen eines Hb D β -Frankfurt, eines Hb E oder gar eines Hb M-Types ist ebenfalls auszuschließen, da diese Hämoglobinanomalien einen erheblich größeren Anteil des Gesamthämoglobins ausmachen. Sie haben im Stärkegel eine abweichende Wanderungsgeschwindigkeit, oder beschreiben in der Spektralanalyse eine andere Kurve.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß es sich bei dieser instabilen Minor-Fraktion um eine neue Hämoglobinanomalie handelt, deren Strukturanalyse aber noch offen steht.

7.0 Z U S A M M E N F A S S U N G:

Es wird über die Untersuchungen eines neuen, abnormen Hämoglobins berichtet. Dieses wurde bei einem Patienten deutscher Abstammung und bei zwei seiner Geschwister gefunden.

Hämoglobinanomalien sind im deutschen Sprachraum relativ selten. Dieses anomale Hämoglobin wurde daher vor allem im Hinblick auf eine mögliche Identität mit in unserem Sprachraum bereits bekannten anomalen Hämoglobinvarianten untersucht. Es wird nachgewiesen, daß das anomale Hämoglobin 7,3% - 7,9% des Gesamt-Hb beträgt. Seine Wanderungsgeschwindigkeit im Stärkeblock und Stärkegel bei pH 8,6 liegt zwischen der des Hb F und der des Hb S. Säulenchromatographisch läßt sich das Minor-Hämoglobin gut isolieren. Durch Hitzeinaktivierung konnte die Thermolabilität des anomalen Hb gezeigt werden. Die spektralanalytischen Untersuchungen geben keinen Anhalt für das Vorliegen eines Hb M oder eines Hb Köln. Der Innenkörperbildungstest zeigte keine pathologischen Befunde. Es wird eine Modifikation dieser Methode angegeben, um eine Innenkörperbildung durch Sulfonamide in vitro festzustellen, wie dies beim Hb Zürich der Fall ist.

Bei vergleichenden Untersuchungen kann keine Übereinstimmung zwischen dem beschriebenen anomalen Hämoglobin und den bisher bekannten Hb-Anomalien gezeigt werden. Es handelt sich somit um eine neue Hb-Anomalie.

8.0 L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S:

1. BACHMANN, F.

Untersuchungen über die Bildung und Struktur der
Innenkörper bei Trägern des Hb Zürich.

In: Lehmann und Betke: Haemoglobin-Colloquium
Wien 1961, p. 66, Thieme, Stuttgart 1962

2. BETKE, K.

Zum Vorkommen von Hämoglobinanomalien in Deutsch-
land.

In: Lehmann und Betke: Haemoglobin-Colloquium
Wien 1961, p. 72, Thieme, Stuttgart 1962

3. BETKE, K.

Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und
reifem Organismus. Eigenschaften, Differenzen und
ihre klinische Bedeutung.

Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954

4. BETKE, K. - E. KLEIHAUER

Hämoglobinanomalien in der deutschen Bevölkerung.
Schweiz. med. Wschr. 42, 1316 (1962)

5. BETKE, K. - H.R. MARTI - I. SCHLICHT

Estimation of small percentages of foetal haemo-
globin.

Nature (Lond.) 184, 1877 (1959)

6. BRAUNITZER, G. - R. GEHRING - MÜLLER - N. HILSCHMANN
K. HILSE - G. HOBOM - V. RUDLOFF - B. WITTMANN
- LIEBOLD
Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins.
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 283 (1961)

7. BEUTLER, E. - R.J. DERN - A.S. ALVING
The hemolytic effect of primaquine.
J. Lab. Clin. Med. 44, 177 (1954)

8. CARELL, R.W. - H. LEHMANN - W. PRIBILLA
Strukturanalyse des Hb Köln.
Klin. Wschr. 23, 1189 - 1193 (1967)

9. CARELL, R.W. - H. LEHMANN - H.E. HUTCHINSON
Haemoglobin Köln (98 Valine →Methionine)
An unstable protein causing inclusion - body
anaemia.
Nature (Lond.) 210, 915 (1966)

10. CHOREMIS, C. - E.W. IKIN - H. LEHMANN - A.E. MOURANT
- L. ZANNOS
Sickle - cell trait and blood groups in Greece.
Lancet 1953 II, p. 909.

11. CLOTTEN, R. - A. CLOTTEN
Hochspannungselektrophorese
Thieme, Stuttgart 1962

12. FESSAS, Ph.

Haemoglobin C in a greek family.

In: Lehmann und Betke:

Haemoglobin-Colloquium, Wien 1961, p. 60

Thieme, Stuttgart 1962

13. FRICK, P.G. - W.H. HITZIG - K. BETKE

Haemoglobin Zürich: A new hemoglobin anomaly associated with acute hemolytic episodes with inclusion bodies after sulfonamid therapy.

Blood 20, 261-271 (1962)

14. GOLDBERG, C.A. - A.C. ROSS

Improved method for the determination of hemoglobin A₂ by starch-gel elektrophoresis with some observations on the technic.

Clin. Chem. 6, 274 (1960)

15. GRIMES, A.J. - A. MEISLER - J.V. DACIE

Congenital Heinz-body anaemia. Further evidence on the cause of Heinz-body production in red cells.

Brit. J. Haemat. 10, 281 (1964)

16. HITZIG, W.H.

Hämoglobin Zürich - Syndrom.

In: Lehmann und Betke:

Haemoglobin-Colloquium Wien 1961, p. 65

Thieme, Stuttgart 1962

17. HITZIG, W.H. - P.G. FRICK - K. BETKE - T.H.J.

HUISMAN

Hämoglobin Zürich: Eine neue Hämoglobinomomalie mit
sulfonamidinduzierter Innenkörperanämie.

Helv. Paed. Acta 15, 499 (1960)

18. HÖRLEIN, H. - G. WEBER

Über chronische familiäre Methämoglobinämie und eine
neue Modifikation des Methämoglobins.

Dtsch. med. Wschr. 73, 476 (1948)

19. HUISMAN, T.H.J.

Normal and abnormal human hemoglobins.

Adv. clin. Chem. 6, 231 (1963)

20. HUISMAN, T.H.J. - B. HORTON - M.T. BRIDGES -

K. BETKE - W.H. HITZIG

A new abnormal human hemoglobin, Hb: Zürich.

Clin. Chem. Acta 6, 347 (1961)

21. HUTCHINSON, H.E. - P.H. PINKERTON - P. WATERS -

A.S. DOUGLAS - H. LEHMANN

Hereditary Heinz-body anaemia, thrombocytopenia,
and haemoglobinopathy (Hb Köln) in a Glasgow family.

Brit. med. J. 2, 1099 (1964)

22. INGRAM, V.M.

A specific chemical difference between the globin of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin.
 Nature (Lond.) 178, 792 (1956)

23. INGRAM, V.M.

Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle-cell haemoglobin.
 Nature (Lond.) 180, 326 (1957)

24. INGRAM, V.M.

Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by "fingerprinting";
 Biochem. Biophys. Acta 28, 539 (1958)

25. INGRAM, V.M.

Chemistry of the abnormal human haemoglobins.
 Brit. med. Bull. 15, 27 (1959)

26. KÖRBER, E.

Über Differenzen des Blutfarbstoffes
 Inaugural- Dissertation, Dorpat 1866
 Zbl. med. Wiss. 5, 177 (1867)

27. KÜNZER, W. - E. AMBS

Zur Trennung und Gewinnung von fetalem Hämoglobin (Hb F) aus Nabelschnurblutfarbstoff mittels Hochspannungselektrophorese.

Klin. Wschr. 36, 831 (1958)

28. KÜNZER, W. - E. AMBS

Die Beweglichkeit verschiedener Hämoglobinderivate bei der Hochspannungselektrophorese.

Klin. Wschr. 37, 249 (1959)

29. KUNKEL, H.G. - G. WALLENIUS

New hemoglobin in normal adult blood.

Science 122, 288 (1955)

30. MARTI, H.R.

Normale und anomale menschliche Hämoglobine.

Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1963

31. MARTI, H.R. - H. LEHMANN - G. KEISER - W. SIEGEN-

THALER

Hb C bei Europäern: Ein neuer, wahrscheinlich homozygoter und drei heterozygote Träger der Anomalie.

Blut 11, 321 (1965)

32. MARTIN, H.

Vorkommen von Hämoglobinanomalien in Deutschland.

In: Lehmann und Betke:

Haemoglobin-Colloquium Wien 1961, p. 70

Thieme, Stuttgart 1962

33. MARTIN, H. - G. HEUPKE - G. PFLEIDERER - W. WÖRNER

Hämoglobin D in einer Frankfurter Familie.

Fol. Haem. (N.F.) 4, 233 (1960)

34. MARTIN, H. - L. NOWICKI

Hämoglobinopathien, Bedeutung und Nachweismethoden.

Sonderdruck aus "G-I-T" Fachzeitschrift für das

Laboratorium, LAB.-Med. Mai 1967, p. 320-326

35. MARTIN, H. - L. NOWICKI - W. WÖRNER

Hämoglobinanomalien und Hämoglobinopathien.

Ärztl. Lab. 13, 406 (1967)

36. MARTIN, H. - W. WÖRNER

Über die Beobachtung von zwei Sippen mit Hb D in
Deutschland.

Proc. 8th Congr. Europ. Soc. Haemt. Wien 1961,

p. 300

S. Karger, Basel - New-York 1962

37. NOWICKI, L.

Methodologische Untersuchungen zur Hämoglobin-Analyse mit Analyse eines neuen anomalen "instabilen" Hämoglobins (Hb Frankfurt).

Habilitationschrift, Frankfurt/Main 1968

38. PAULING, L. - H.A. ITANO - S.J. SINGER - J.C. WELLS

Sickle cell anaemia, a molecular disease.

Science 110, 543 (1949)

39. PEROSA, L. - G. MAGNANELLI - G. DALFINO

Il primo caso di Hb C- thalassemia descritto in Italia. Rivista sintetica sulla emoglobina C.

Haematologica 46, 211 (1961)

40. PERUTZ, M.F. - M.G. ROSSMANN - A.F. CULLIS -

H. MUIRHEAD - G. WILL - A.C.T. NORTH

Structure of haemoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 5,5 Å resolution obtained by X-ray analysis.

Nature (Lond.) 185, 416 (1960)

41. POULIK, M.D.

Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffer.

Nature (Lond.) 180, 1477 (1957).

42. PRIBILLA, W.

Thalassämie - ähnliche Erkrankung mit neuem Minor-Hämoglobin (Hb Köln).

In: Lehmann und Betke:

Haemoglobin-Colloquium, Wien 1961, p. 73

Thieme, Stuttgart 1962

43. PRIBILLA, W.

Hämoglobin - Köln - Disease.

Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon 1963

Karger, Basel - New-York 1963

44. PRIBILLA, W. - P. KLESSE - K. BETKE - H. LEHMANN - D. BEALE

Hämoglobin Köln - Krankheit: Familiäre hypochrome hämolytische Anämie mit Hämoglobinanomalie.

Klin. Wschr. 43, 1049 (1965)

45. SILVESTRONI, E.

Emoglobine abnormi ed emoglobinopatie in Italia.

Policlinico, Sez. prat. 66, 1373 (1959)

46. SILVESTRONI, E. - J. BIANCO

New data on microdrepanocytic disease.

Blood. 10, 623 (1955)

47. SINGER, K. - A.J. CHERNOFF - L. SINGER

Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematological disorders by means of alkali denaturation.

Blood 6, 413 (1951)

48. SMITHIES, O.

Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults.

Biochem. J. 61, 629 (1955)

49. SMITHIES, O.

An improved procedure for starch gel electrophoresis. Further variations in the serum protein of normal individuals.

Biochem. J. 71, 585 (1959)

50. WÖRNER, W. - H. MARTIN

Abnorme Hämoglobine. Nachweis und klinische Bedeutung.

F. D. M. 16, 613 (1966)

Lebenslauf

Am 28. April 1943 wurde ich als Sohn des Dr. med. Karlheinz Wagner und dessen Ehefrau Auguste, geb. Kuhl, in Giessen geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule und von 1954 an die Alexander v. Humboldt-Schule, Gymnasium, in Lauterbach/Hessen, wo ich im März 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Justus Liebig-Universität in Giessen das Studium der Medizin. Im März 1964 bestand ich hier die naturwissenschaftliche Vorprüfung und beendete im April 1966 das vorklinische Studium mit der ärztlichen Vorprüfung. Während des Sommersemesters 1966 und des Wintersemesters 1966/67 studierte ich an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg. Zum Sommersemester 1967 kehrte ich an die Justus Liebig-Universität in Giessen zurück und bestand am 18. September 1969 die ärztliche Prüfung.

Seit dem 1. Oktober 1969 bin ich als Medizinalassistent tätig und arbeitete bisher 4 Monate bei einem prakt. Arzt in Lauterbach, sowie 4 Monate auf der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses in Alsfeld. Zur Zeit leiste ich meine Medizinalassistentenzeit auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Lauterbach ab.

Seit dem 2. August 1969 bin ich verheiratet.

